

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-204200

(43)Date of publication of application : 19.11.1984

(51)Int.Cl. C07H 21/02

G01N 33/54

// C12Q 1/68

G01N 33/50

(21)Application number : 58-075878

(71)Applicant : WAKUNAGA SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 28.04.1983

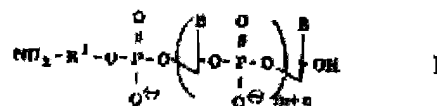
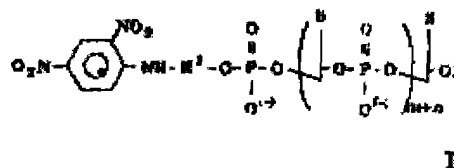
(72)Inventor : MIYOSHI KENICHI  
SUZUKI MASANORI  
FUWA TORU

## (54) 2,4-DINITROPHENYLNUCLEOTIDE DERIVATIVE AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

**NEW MATERIAL:**2,4-Dinitrophenyl-

oligodeoxyribonucleotide of formula I (m and n are 0 or natural number; R1 is hydrocarbon residue; B is base constituting nucleotide).

**USE:** Affinity probe for nucleic acid. Since the compound is devoid of DNP at the base part of the nucleotide, it has stable melting point (Tm value) and can be stored stably.**PREPARATION:** The compound can be prepared by bonding 2,4-dinitrobenzene to the terminal amino group of the oligonucleotide derivative of formula II.

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭59-204200

⑫ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和59年(1984)11月19日
C 07 H 21/02		7252-4C	
G 01 N 33/54		H 7906-2G	発明の数 2
J C 12 Q 1/68		8213-4B	審査請求 未請求
G 01 N 33/50		Z 8305-2G	

(全 9 頁)

⑭ 2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体およびその製造法

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑮ 発明者 不破亨

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑯ 特 願 昭56-75878

⑰ 出 願 昭58(1983)4月28日

⑱ 発 明 者 三好健一

広島県高田郡甲田町下甲立1624  
湧永製薬株式会社中央研究所内

⑲ 出 願 人 湧永製薬株式会社

大阪市福島区福島三丁目1番39号

⑳ 発 明 者 鈴木正則

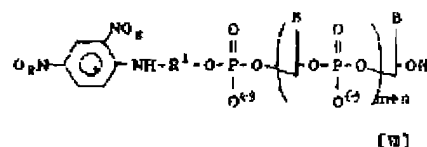
㉑ 代 理 人 弁理士 猪股清 外3名

## 明 細 書

1. 発明の名称 2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式〔Ⅱ〕で示される2、4-ジニトロフェニル-オリゴアザキシリボスクレオチドであることを特徴とする、2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。



〔ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の自然数であり、R<sup>1</sup>は2個の置換または分岐鎖の炭化水素基であり、Bはスクレオチドを構成する炭素である（Bが置換基存在するとき

は、それらは同一でも異なってもよい）。〕

2. 糖基Bがアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載の2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

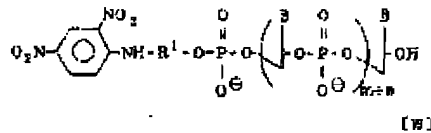
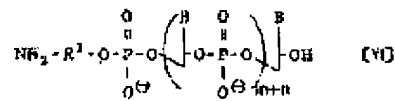
3. R<sup>1</sup>が炭素数2〜20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1項または第2項記載の2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

4. mが0または5までの自然数、nが0または40までの自然数である、特許請求の範囲第1〜3項のいずれか一項に記載の2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体。

5. 下式〔Ⅲ〕で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基と2、4-ジニトロベンゼンを結合させて下式〔Ⅱ〕で示される2、4-ジニトロフェニル-オリゴアザキシリボスクレオチドを得ることを特徴とする、2、4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。

## 特開59-204200(2)

1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンである。特許請求の範囲第5項記載の2,4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。



〔ただし、 $\text{R}^1$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2個の基または分岐鎖の炭化水素鎖であり、Bはスクレオチドを構成する塩基である（Bが複数個存在するときは、それらは同一でも異なってもよい）。〕

6. アミノ基と2,4-ジニトロベンゼンとの結合を、アミノ基と1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンとの脱ハロゲン化水素反応によつて行なわせる、特許請求の範囲第5項記載の2,4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法。

7. 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンが

フェニル（以下DNPと略す）基を被置に結合させた、DNAプローブが開発されている（Nucleic Acids Rev., 30, 6787-6796 (1982)）。彼らは、アデノシン三リン酸（ATP）のDNP誘導体をDNA鎖に取り込ませ、相補的塩基配列を持つDNAにハイブリダイズさせたのち、DNPに対するウサギ抗血清およびパーオキシダーゼで標識したグサビ免疫グロブリンG型（IgG）に対するヒツジ抗血清を順次加えて目的DNAを抽出している。ここで用いたDNA鎖は、天然から取り出したフラグメントである。

しかし、本発明者らの知るところによれば、このようにして調製されるDNP-スクレオチド誘導体には下記のような問題点がある。

(a) スクレオチドの塩基部分にDNPを含有するため、使用オリゴスクレオチド固有の融解温度（ $T_m$ 値）に変化を生じる。

(b) 融解温度のずれから検出の際にDNAの

## 3. 発明の神髄な説明

## 発明の背景

## 技術分野

本発明は、一般に、2,4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体に関する。さらに具体的に、本発明は、スクレオチドの塩基以外の部分に2,4-ジニトロベンゼンを結合させてなる2,4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このような2,4-ジニトロフェニルスクレオチド誘導体の製造法にも関する。

## 先行技術

放射線同位元素を使わず、特異な抗体や酵素によつて検出することができる、あるいはオリゴスクレオチド誘導体は、検疫用プライマーとして興味を持たれている。

近年、Vincent らによつて、2,4-ジニトロ

フェニルスクレオチド誘導体は、その応用範囲が狭く、有用性が限定されているのが現状である。

## 発明の概要

## 要 旨

本発明は上記の欠点を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボスクレオチドのスクレオチド塩基以外の特定の部位に2,4-ジニトロベンゼンを結合させてなるDNP-スクレオチド誘導体によつてこの目的を達成しようとするものである。

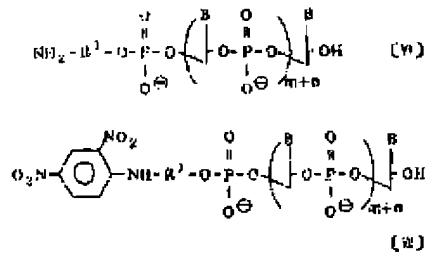
従つて、本発明によるDNP-スクレオチド誘導体は下式【Ⅷ】で示されるDNP-オリゴデオキシリボスクレオチドであること、を特徴とするものである。

また、本発明によるDNP-スクレオチド誘導体の製造法は、下式【Ⅷ】で示されるオリゴスクレオチド誘導体の末端アミノ基に、4-ジニトロフェニル基を結合させることである。

JP,59-204200,A

☒ STANDARD ☐ ZOOM-UP ROTATION ☐ No Rotation ☐ REVERSAL

## 特開昭59-204200(3)



〔ただし、 $m$ および $n$ はそれぞれ0または任意の自然数であり、 $\text{R}^1$ は2個の置換または分岐鎖の炭化水素残基であり、 $\text{B}$ はヌクレオチドを構成する塩基であり、 $\text{B}$ が複置鎖存在するときは、それらは同一でも異なってもよい。〕

## 発 明

本発明者らの合成した DNP-オリゴデオキシリボヌクレオチドは、放射線検出用放射能アフィニティプローブの応用を認識することができ、下記のような長所をもつものである。

(i) ヌクレオチドの塩基部分に DNP を含有しないので、触媒塩基 (Tm 値) に変化を生じることが

なくて安定である。

(ii) いくつもの塩基配列をもつ DNP-オリゴヌクレオチドも合成可能である。

(iii) プローブとして短鎖オリゴマーで十分である。

(iv) 合成が非常に簡単であつて大量合成が可能であり、また長期保存も可能である。

(v) プライマー (筋織合成の際の DNA 断片) としても利用できる。

最近、報告には、筋織の合成オリゴヌクレオチドを用いてターグロビンの遺伝子鎖の断断を行なつており (Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 80, 278-282 (1983)、遺伝子中のわずか一つの塩基配列の違いも検出できる合成オリゴヌクレオチドが各種遺伝子断断剤に有用であることを示している。

彼らは合成オリゴヌクレオチドの放射能同位体素 ( $^{32}\text{P}$ ) を使用したが、代わりに本発明者らが開発した DNP-ヌクレオチド誘導体を用いることができれば、非常に有用なことは明白であろう。

このような長所があるところから、本発明の

DNP-ヌクレオチド誘導体の利用用途の拡大も考えられる。

すなわち、たとえば、DNP-オリゴヌクレオチドは、放射線検出用放射能アフィニティプローブとして、あるいはプライマーとして、利用可能であることは前記したところであつて、その検出方法は抗体による沈降、酵素免疫活性測定、蛍光検出、抗体による可視化等々、多様であり、また本発明の DNP-ヌクレオチド誘導体は放射能プローブ ( $^{32}\text{P}$ ) に比べて検出の簡便、コスト、試薬物の処理および保存性の点でも有利である。

なお、DNP 塩は、市販のウサギ抗血清 (たとえば Miles Laboratories, Code No. 61-006-1) または、DNP に対するモノクローナル抗体によつて容易に検出することができる。

## 発明の具体的説明

## DNP-ヌクレオチド誘導体 (H)

本発明による DNP-ヌクレオチド誘導体は、前記の式 (H) で表されるものである。

式中、記号  $\text{B}$  は、2'-デオキシリボヌクレオ

チドの 3'-および 5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオチド残基を示すのに用いられているものであつて、具体的には下記の構造のものである。



置換基  $\text{B}$  はヌクレオチドを構成する塩基を示し、通常はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンである。化合物 (H) 中に  $\text{B}$  が複置鎖存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい。

$m$  および  $n$  は、それぞれ0または自然数を示す。本発明 DNP-オリゴヌクレオチド誘導体の重合度は  $m+n$  で表されているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれ  $m$  および  $n$  のフラクションを混合させていることによるものである (詳細後記)。その場合の  $m$  は実数的には 0~6、特に 1~4、 $n$  は実数的には 0~40、特に 0~20、

## 特開昭59-204200(4)

である。

基 $R^1$ は、化合物[W]の置換部分とDNP部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖である。これは、特に炭素数2〜20程度の直鎖または分岐鎖のアルキレン基が適当である。好ましい $R^1$ は、炭素数2〜6のアルキレン基である。

## 化合物[W]の合成

## 一般的説明

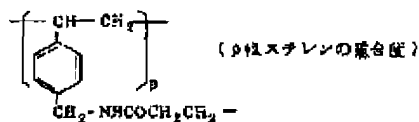
化合物[W]、すなわち本発明によるDNP-ヌクレオチド誘導体、は合目的的な任意の方法によつて合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式[V]のオリゴヌクレオチド誘導体、すなわちオリゴデオキシヌクレオチドの5'-末端リン酸基に基 $R^1$ を介して一般アミノ基を導入されたもの、のアミノ基にDNPを結合させることからなるものである。

一方、式[V]の化合物は、オリゴヌクレオチドの合成および生成オリゴヌクレオチドの5'-末端磷酸基上での一般アミノ基の導入からなる方法で合成することができる。

イルブアニン、N-インブチリルブアニン、 $N^6$ -ベンゾイルグアニンおよびチミン(すなわち、保護不変)より選択される。

⑥ スーパーを介した担体であつて、通常は下記のものである。



## 化合物[W]の合成

一般にオリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの副反応および後処理がある。本発明者らは既に副反応によるオリゴヌクレオチド製造技術を確立しており、化合物[W]の合成には本発明者らの下記の方法が好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 8635(1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)

Nucleic Acids Research 6, 5491(1980)

第1圖は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は、下記の意味を持つ(その意図ないし解題は、記載した通りである)。

$R^0$  リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

$R^1$  二価の炭化水素置換基である。

$R^2$  5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基が用いられる。

$R^3$  他のすべての保護基が安定な条件下で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用いられる。

$R^4$  アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロメチル基が用いられる。

o 小より小さい任意の自然数。

m 0または任意の自然数。

n 0および任意の自然数。

B 塩基を示す。

B' 置換された塩基を示すが、通常は $N^6$ -ベンゾ

Nucleic Acids Research 8, 5507(1980) .

Nucleic Acids Research Symposium Series

7, 201(1980)

また、上記で合成したオリゴヌクレオチドの5'-水酸基にリン酸基を介して一般アミノ基を導入する方法、すなわち化合物[W]の合成法としては、たとえば本発明者らの特開昭57-138136号明細書記載の方法がある。

化合物[W]の合成法をその一実施例について示せば、下記の通りである。すなわち、第1圖に示したように、化合物[I]の保護基 $R^3$ を除去したものと化合物[N]の保護基 $R^2$ を除去したものとを結合させ、これらの操作をくり返すことによつて、化合物[W]を合成する。オリゴヌクレオチド化合物[W]の合成法は、上記の通り公知である。

一方、本発明者らの方法(特開昭57-138136号明細書記載)に従つて、式[V]の化合物を合成する。すなわち、化合物[I]の $R^3$ を除去して5'-水酸基化合物とし、これにリン酸化剤(たとえば、ホスホジトリブライド、ホスホジクロリドま

## 特開59-204200(B)

たはホスホジベンゾトリアゾリド等)を作用させてリン酸化し、ついでアミノ基が保護されているアミノアルコール化合物  $R^2-NH-R^1-OH$  [この化合物はオメガ・アミノアルコール ( $NH_2-R^1-OH$ ) のアミノ基を  $R^2$  で保護することにより得ることができる] を結合させることにより、化合物 [IV] を得ることができる (詳細は説明欄を参照)。

この化合物 [IV] の保護基  $R^2$  を除去し、化合物 [IV] の保護基  $R^2$  を除去したものと結合させて、化合物 [V] を合成する。即ち、化合物 [IV] の合成の段の結合と本質的には異なる方法で行なうことができる。

このようにして合成された化合物 [V] の保護基をすべて除去すれば、化合物 [VI] が得られる。保護基 CO— $\text{C}_6\text{H}_4$ — $\text{C}_6\text{H}_4$ —、リン酸トリエステル中のオルト・クロロフェニル基および塩基部分のアシル基は、0.5% のテトラメチルゲアミン・ピリジン・2-カルボアルデヒドのジオキサン-水 (1:1) (V/V) の溶液で処理後、アルカリ処理 (濃アンモニア水) を行なうことにより除去される。  $R^1$  が

とすることによって得ることができる。

両者の結合は、2,4-ジニトロベンゼンの1-位と化合物 [VI] のアミノ基との間の C-N 結合の形成を促進することのできる任意の方法によって行なうことができる。

両者の結合は、一般に、前者の誘導体、すなわち ONP-X (X は 1-置換基) とアミノ基との間の H-X 結合によることによつてである。X としては、ハロゲンが好ましい。X がハロゲンである誘導体、すなわち 1-ハロゲン-2,4-ジニトロベンゼンが好ましいのは、一般に、オリゴヌクレオチドの塩基部分のアミノ基とは反応しないので 3'-水酸基末端基の上の一級アミノ基とのみ選択的に反応し、しかも反応操作が簡便だからである。とりわけ、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンは市販され容易に入手でき、難かな反応条件で化合物 [VI] のアミノ基との反応が進行する。

1-ハロゲン-2,4-ジニトロベンゼンと化合物 [VI] との反応は、両者の均一溶液中 (溶媒は、たとえば含水アルコール) あいはい不均一溶液中

トリフルオロアセチル基の場合は、アノミア処理により充分脱脂され、オルトニトロフェニルスルフェニル基である場合はメルカプトエタノール処理が必要である。  $R^1$  として他の保護基を用いた場合は、オリゴヌクレオチド部分が安定な条件で、さらに別の処理を加えることも可能である。なお、デオキシオリゴリボヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて、塩基の種類およびその導入しないし除去ならびに結合その他について上記以外の詳細は核糖の化学合成に関する成書や文献たとえば「ヌクレオチド・ヌクレオチドの合成」(丸井 1977年)、「核糖有機化学」(化学同人 1978年)、「核糖」(朝倉書店 1979年)、Tetrahedron, **34**, 5143 (1978)、重合化, **24**, 723 (1978) および化学の雑誌, **33**, 666 (1979) 等を参照することができる。

## 化合物 [VI] の合成

DNP-オリゴデオキシリボヌクレオチド (化合物 [VII]) は、上記化合物 [VI] の 3'-末端基の上の一級アミノ基に 2,4-ジニトロベンゼンを結合

(溶媒は、たとえば水)、ハロゲン化水素捕捉剤 (たとえば、炭酸水素ナトリウム、トリエルアミン、水酸化カリウム等) の存在下、10-50℃ 程度の温度で実施することができる。目的生成物は、たとえば抽出によつて阻取すればよい。なお DNP 化に關しては、適当な溶媒、たとえば「実験化学講座 1、蛋白質の化学 II、第 118 頁」(1976年 (丸井 (株) 発行) 等を参照することができる。

## 実 験 例

## 1) フローチヤート

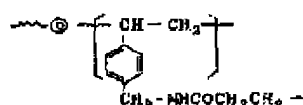
図 2 のフローチヤートに従つて、本発明化合物 (同図の化合物 ①) を製造した。

図 2 中で、記号は次の意味を持つ。

B: ベンゾイル化アデニン

B: アデニン

DMT: ジメトキシトリチル



R<sup>0</sup> オルトグロフニエル

图 1 主井井口

CE - ノアノエテル

2 17

п' 2

12

2) 化合物[7] (第2図の④) の合成

### 實驗 1 - 1

バートン・トリプル・デノシン / 増田 (0)

(樹脂は溶解に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外証的には樹脂そのものと見えないので、樹脂に担持された当該化合物を以下において巨大樹脂と呼ぶことにする) 300mg (0.033mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15:15, V/V) 溶液 10ml で 3 回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8ml で 5 分間ずつ 4 回反転(脱トリチル化)させて樹脂〔②〕を得る。樹脂〔②〕をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10ml で 3 回洗浄し、これにジメチルacetate〔③〕 150mg (0.1mmol) のピリジ

をクロロホルムで溶解した後、水、0.5%リン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および5%の塩化ナトリウム水溶液でそれぞれ洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を蒸留後、トリカゲルカラムで精製し（抽出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用）し、蒸留液を濃縮後ベンゼン中に添加し高沸点の化合物〔6〕を経る。

上記で合成した化合物〔④〕( $n=12$ ) 115 mg、  
(3.45  $\mu$ mol) を前述と同様の方法で脱トリサル  
化したもの〔⑦〕 $\beta$ 、化合物〔⑤〕60 mg (0.44  $\mu$   
mol) をトリエチルアミン-ピリジン-水(1:3:  
1, v/v/v) 溶液 3 ml で溶解(脱シアノエチル化)  
した化合物〔⑥〕を加え、飯水化したのち、  
MINT 50 mg (0.2 mmol) およびピリジン 1 ml を  
加え 60 分間反応(結合)させ、反応終了後ピリジ  
ンおよびメタノールで洗浄し、蒸発して、完全に  
保護されたオリゴヌクレオチド誘導体〔⑧〕を得  
る。

オリジンクレオチド誘導体〔9〕1Emgを0.5M

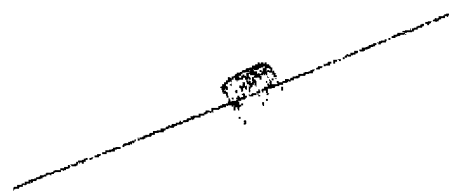
電話0359-204260-(8)

ン酸液を加え、共沸させて蒸を排水とし、メチレンスルホニルニトロリアジアリド(以下MGNと略す) 150mg (0.5mmol) と無水ピリジン 2 ml とを添加して90分間反応(混合)させる。反応後、ピリジン40ml で3回洗浄し、抽出液(約10mg)のジメチルアミノピリジン(以下DMAF)を含む無水酢酸-ピリジン(1:9、V/V)懸液10ml を添加し30分間反応させて未反応5%-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して、化合物[④'] (n=2)を得る。以上のような操作を6回くり返して、化合物[④] (n=12)を得る。

一方、5'-ヒドロキシ-βヌクレオチド〔5〕  
800 mg (0.7 mmol) とオルトクロロフェニルホ  
スホジトリアジリドとを接着のジオキサン溶液  
(1.0 mmol, 6 ml) 中で2時間反応させ、続いて  
トリフルオロアセチル-6-プギノヘムサノール  
300 mg (1.4 mmol) とおよび1-メチル-イミダ  
ゾール 116 mg (1.4 mmol) を加えてさらに2時間  
反応させる。反応終了後、溶液を蒸発し、残液

トリメチルゲルマニウムトリシランを、カルボ  
 アルボグナイトのノオキセン・水（9：1、  
 (V/V) 希液 200  $\mu$ l) を加え、反応管中、室温で24  
 時間反応させる。反応後、酢アンモニア水（2.5  
 ml）を加えて密閉し、50℃で一晩反応させる。反  
 応終了後、蒸過し、母液を微細漏斗、水で溶解させ  
 てからエーテルで抽出を行なう。水相を蒸発後、  
 セフアデクサス G-50 (6) 1.5  $\times$  120 cm、抽出液は  
 0.05 M の重炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液  
 (pH 7.5) で図 4 依拠してペンタデカアザニル酸誘導  
 体 (1) を得た。

また同様の方法で実験 1-2, 1-3 および 1-4 のようなオリガスタレンオキド誘導体を得た。  
以上で合成した化合物を第 1 表に示す。



第1表

実験例 試料	化合物⑩の内容	
	m+n	(B) <sub>m+n</sub>
1-1	14	AAAAAAAAAAAAAAAA
1-2	14	TTTTTTTTTTTTTTTT
1-3	14	GGATGCATCACCACC
1-4	16	AACTCTGCTGAGAAAGCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

これら4種の化合物の高速液体クロマトグラフィーの結果を第3図に示す。A～Dは、それぞれ実験1-1～1-4の化合物についての図である。

3) 2, 4-ジニトロフェニル・ペンタデカアデニル酸〔⑩〕の製造

#### 実験2-1

上記実験1-1で合成したペンタデカアデニル酸等価体〔⑩〕約1.0gを0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(pH8.3)10mlに溶解し、1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンのエタノール溶

特開59-288200(ア)

液(50mg/ml)5ml(大過剰)を加えて37℃で2時間反応させた後、20mlを加えエーテル150mlで4回抽出を行ない、2, 4-ジニトロフェニル・ペンタデカアデニル酸〔⑩〕を得る。反応の促進は、高速液体クロマトグラフィーにより行なつた。

またその際、反応性の比較のため上記で合成したオリゴヌクレオチド〔⑨〕を炭酸水素ナトリウム水溶液をもつ化合物〔⑩〕も同様に1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンと反応させる。

上記実験1-2, 1-3および1-4で合成した化合物〔⑩〕についても実験2-1と同様な操作を行なつて各々について化合物〔⑩〕を製造する。また、反応の比較のため5'-水酸基をもつ化合物〔⑩〕をも製造し、化合物〔⑩〕と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを各々反応させる。このときの実験を各々実験2-2, 2-3および2-4とした。

実験2で製造した化合物を第2表に示す。

第2表

実験例	化合物⑩の内容		化合物⑩の内容	
	m+n	(B) <sub>m+n</sub>	m+n	(B) <sub>m+n</sub>
2-1	14	AAAAAAAAAAAAAAAA	14	AAAAAAAAAAAAAAAA
2-2	14	TTTTTTTTTTTTTTTT	14	TTTTTTTTTTTTTTTT
2-3	14	GGATGCATCACCACC	14	GGATGCATCACCACC
2-4	16	AACTCTGCTGAGAAAGCGC	16	AACTCTGCTGAGAAAGCGC

ただし、この表でAはアデニン、Tはチミン、Gはグアニン、Cはシトシンを示す。

以上の結果を第4図(高速液体クロマトグラフィーの結果)に示す。

第4図は高速液体クロマトグラフィーの流出パターンを示すものである。图中、1は何れも反応前の化合物そのもの、2は何れも化合物と1-フルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンとを反応させたもののクロマトグラムである。イは実験2-1で式〔⑩〕である化合物、ロは実験1-1で式〔⑩〕である化合物、ハは実験2-2で式〔⑩〕である化合物、ニは実験2-3で式〔⑩〕である化合物、ホは実験2-4で式〔⑩〕である化合物、ヘは実験1-3で式〔⑩〕である化合物、トは実験2-4で式〔⑩〕である化合物、チは実験1-4で式〔⑩〕である化合物について上記のような操作を行なつた際のクロマトグラムを示す。なおピーク上の数値は保持時間を示す。

これらの結果からみれば、式〔⑩〕で示される5'-水酸基をもつ化合物(第4図のイ-1, ハ-1,



ホ-1、およびト-1)は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応していないことがわかる(第4図ロ-2、ハ-2、ホ-2、およびト-2)。

それに対してオリゴステレオチド誘導体〔Ⅳ〕は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応させると、高速液体クロマトグラフィーの検出パターンが変化して、原料のピーク(第4図ロ-1、ニ-1、ハ-1およびチ-1)はなくなっており、1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと反応して新しい化合物(第4図ロ-2、ニ-2、ハ-2およびチ-2)ができていることがわかる。

すなわち、一級アミノ基を有する化合物〔Ⅳ〕は1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼンと選択的に反応し、B'-水酸基をもつ化合物〔Ⅴ〕とは全く反応しないことがわかる。

なお、第4図の保持時間5分程度で各々検出されるピークは、2,4-ジニトロフェノールと考えられる。

#### 特開59-204204(B)

上記において、高速液体クロマトグラフィーは日本分光HPLC System Tri-Rotorを用い、次の条件により測定を行なった。

カラム :  $\mu$ -Bondapak C18 (Waters)

流速 : 2 ml/分

検出液 : アセトニトリルを含む、20 mM-

TBAA緩衝液 (pH 7.2)

検出割合 : アセトニトリルの濃度5~14% / 16分(16分以後は14%を越える)

#### 4. 図面の簡単な説明

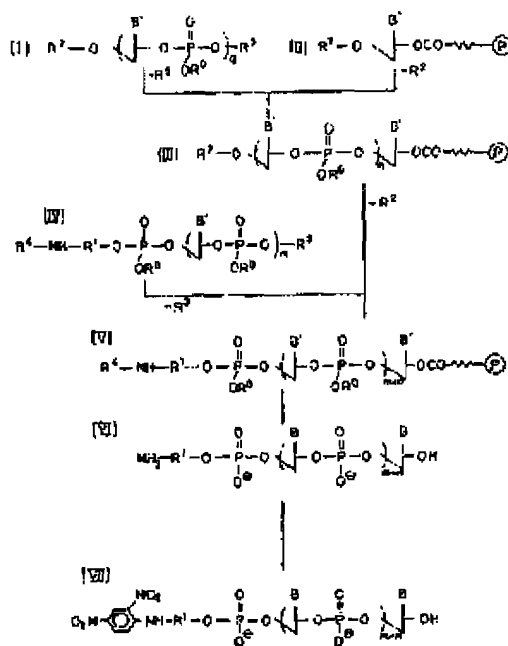
第1図は、本発明の化合物を合成する方法の一例を示すフローチャートである。

第2図は、実施例で示した本発明化合物の製造法のフローチャートである。

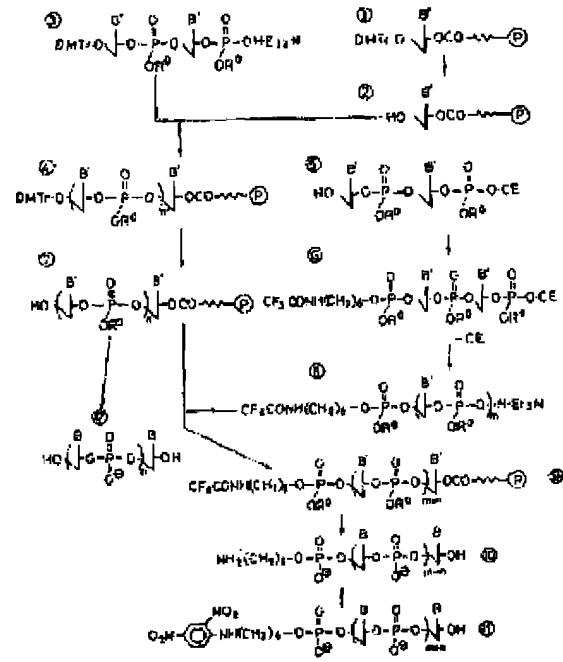
第3図A~Bは、実施例で示した化合物〔VI〕の高速液体クロマトグラフィーの検出を示す図である。

第4図は、高速液体クロマトグラフィーの検出パターンを示す図である。

第1図

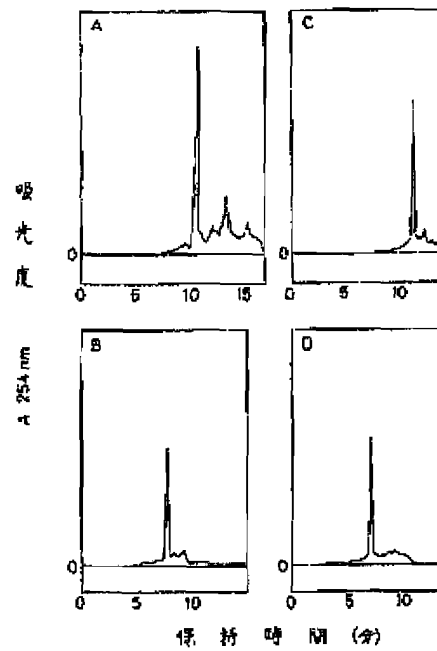


第2図

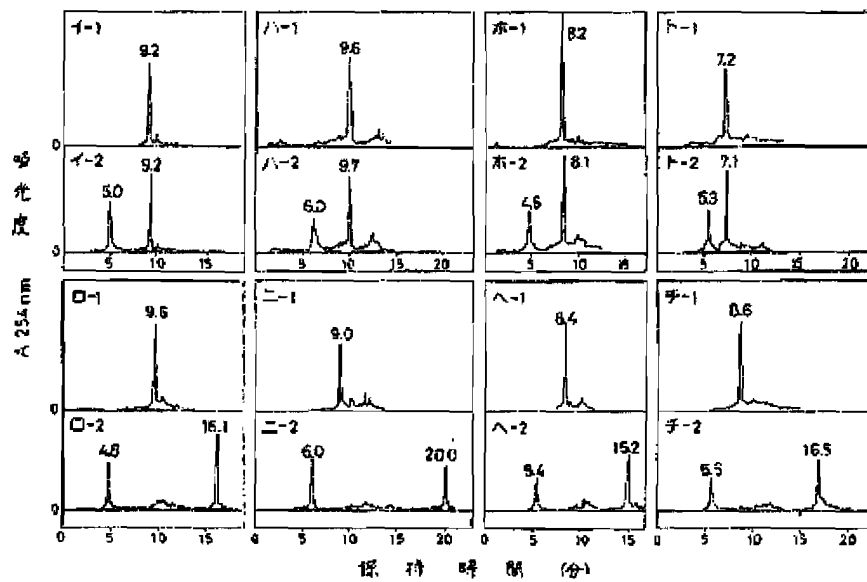


3984558-204204 (9)

第 3 図



第 4 図



## 特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和 58 年特許願第 75878 号(特開昭  
59-204200 号、昭和 59 年 11 月 19 日  
発行 公開特許公報 59-2042 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2の規定による補正があっ  
たので下記のとおり掲載する。 8 ( 1 )

Int. Cl. <sup>1</sup>	識別 記号	庁内整理番号
C07H 21/02 // C13Q 1/58 C01N 38/50		7417-4C A-6807-4B P-7065-2G

## 8. 補正の内容

(1) 発明の名称「2, 4-ジニトロフェニルヌク  
レオチド誘導体およびその製造法」を「2, 4-  
ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体」に補正す  
る。

(2) 特許請求の範囲を別紙の通り補正する。

(3) 明細書第4頁12～13行の「本発明は、  
……にも関する。」を削除する。

(4) 同書第6頁15行から第7頁1行の「また、  
……〔VI〕」を削除する。

(5) 「オリゴヌクレオチドの放射性」を「オリ  
ゴヌクレオチドの検出に放射性」に補正する。

(6) 同書第8頁最終行～第9頁2行の「このよ  
うな……考えられる。」を削除する。

(7) 同書第9頁7～8行の「蛍光性染色体によ  
る」を「蛍光性染色による」に補正する。

(8) 同書第9頁15行～16行の間に「このよ  
うな長所があるところから、本発明のDNP-ヌク  
レオチド誘導体の利用方法の拡大も考えられる。」  
を改行して挿入する。

平成 2. 2. -6 発許

予 説 補 正 書

平成 1 年 3 月 2 日

特許庁長官 吉 岡 文 雄 敬

## 1 事件の概要

昭和 58 年特許願第 75878 号

## 2 発明の名称

2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘  
導体

## 3 補正をする者

事件との関係 発明者本人  
徳永製薬株式会社

## 4 代理人(郵便番号 194)

東京都千代田区丸の内三丁目2番3号  
【電話東京 (231)2321 大代表】

0428 弁護士 佐 藤 一

## 5 補正命令の日付

発令日 平成 年 月 日

## 6 補正により減少する発明の数 ( )

## 7 補正の対象

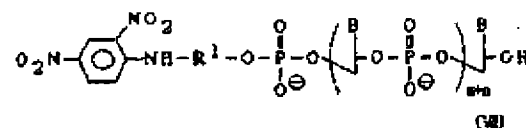
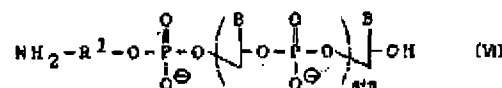
明細書の「発明の名称」、「特許請求の範  
囲」、及び「発明の詳細な説明」の各篇

特許庁

1 A 2 A

(9) 同書第11頁12行の「一つの好ましい方  
法は、」と「前記の式〔VI〕」の間に下記の内容  
を挿入する。

「下式〔VI〕で示されるオリゴヌクレオチド誘  
導体の末端アミノ基に2, 4-ジニトロベンゼンを  
結合させて下式〔VII〕で示されるDNP-オリゴ  
デオキシリボヌクレオチドを得ること、を特徴と  
するものである。」



(ただし、mおよびnはそれぞれ0または任意の  
自然数であり、R<sup>1</sup>は2価の連結または分岐鎖の  
炭化水素基であり、Bはヌクレオチドを構成す  
る塩基である(Bが糖基であるときは、それ

## 手続 2.2.-6 発行

もは同一でも異なってもよい。)

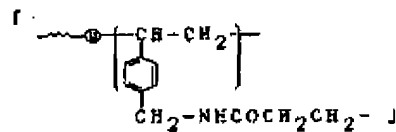
すなわち、この方法は、]

(10) 同書第16頁7行の「デオキシオリゴリボスクレオチド」を「オリゴデオキシリボスクレオチド」に補正する。

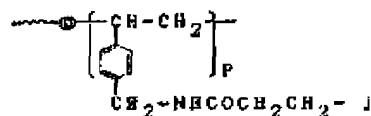
(11) 同書第17頁13行の「5'-水酸基末端」を「5'-末端」に補正する。

(12) 同書第18頁8行の「(1976年(丸帯)(特)発行)」を「(1976年、丸帯(特)発行)」に補正する。

(13) 同書第18頁最末行の



を



「 第 2 表

消 失 特 殊 例	化合物の内容		消 失 特 殊 例	化合物の内容	
	n	(B) <sub>n</sub> B		m+s	(B) <sub>m+s</sub> B
3-1	12	AAAAAAAAAA	2-1	14	AAAAAAAAAAAA
3-2	13	TTTTTTTTTTT	2-2	14	TTTTTTTTTTTTT
3-3	12	ATGCGTACGCGC	2-3	14	CGATGCTACGCGC
3-4	14	TTTGTGTGAGAGCGC	2-4	16	AATCTGCTGAGAGCGC

(22) 同書第26頁9～10行の「実験2-1」

を「実験3-1」に補正する。

(23) 同書第26頁10行の「実験1-1」を「実験2-1」に補正する。

(24) 同書第26頁11行の「実験2-2」を「実験3-2」に補正する。

(25) 同書第26頁12行の「実験1-2」を「実験2-2」に補正する。

(26) 同書第26頁13行の「実験2-3」を「実験3-3」に補正する。

に補正する。

(14) 同書第19頁5行の「n' 2」を削除する。

(15) 同書第22頁2行の「アルドキシメイト」を「アルドキシム」に補正する。

(16) 同書第24頁3行の「4回抽出」を「4回試薬の除去」に補正する。

(17) 同書第24頁10行の「と反応させる。」を「と反応させる(対照実験3-1)。」に補正する。

(18) 同書第24頁13行の「を製造する。」を「を製造する。この実験をそれぞれ2-2、2-3、2-4とする。」に補正する。

(19) 同書第24頁下から3～2行の「実験2-2、2-3および2-4」を「実験3-2、3-3および3-4」に補正する。

(20) 同書第24頁最末行の「化合物を」を「化合物および対照実験3を」に補正する。

(21) 同書第25頁の第2表を次の通り補正する。

「実験2-3」に補正する。

(28) 同書第26頁14～16行の「実験2-4……実験1-4」を「実験3-4で式(8)である化合物、すは実験2-4」に補正する。

JP,59-204200,A

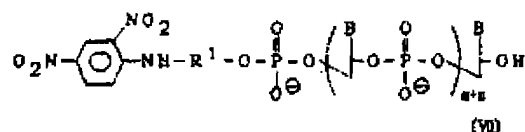
◎ STANDARD ○ ZOOM-UP ROTATION No Rotation □ REVERSAL

RELOAD PREVIOUS PAGE NEXT PAGE

平成 2. 2. -6 発行

特許請求の範囲

1. 下式〔VII〕で示される 2, 4-ジニトロフェニル・オリゴデオキシリボヌクレオチドであることを特徴とする、2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。



(ただし、m および n はそれぞれ 0 または任意の自然数であり、R<sup>1</sup> は 2 糖の塩基または分岐鎖の炭化水素基であり、B はヌクレオチドを構成する塩基である (B が複数存在するときは、それらは同一でも異なってもよい)。)

2. 塩基 B がアデニン、チミン、シトシンおよびグアニンからなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第 1 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

3. R<sup>1</sup> が炭数 2 ~ 20 の直鎖または分岐

鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第 1 項または第 2 項記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。

4. m が 0 または 6 までの自然数、n が 0 または 40 までの自然数である、特許請求の範囲第 1 ~ 3 項のいずれか一項に記載の 2, 4-ジニトロフェニルヌクレオチド誘導体。